植物組織の高圧(加圧)凍結

/ ace+学+学

高圧凍結,微小管,細胞骨格,植物組織,タマネギ子葉

1. はじめに

キーワード:

多くの植物細胞は、細胞膜の外に熱伝導や樹脂の浸透の悪い細胞 壁を持つ.そのため、動物細胞よりも常圧下での急速凍結可能な範 囲が狭く、高圧(加圧)凍結法を用いることでやっと細胞の電子顕 微鏡観察に適した凍結固定が可能になった植物材料も多い¹⁾.また、 その後の樹脂置換などの過程も特別な工夫が必要となる.本稿では、 我々が現在行って良い結果を得ている、高圧凍結を使った植物組織 の試料作製方法を技術的なことを中心に解説する.

2. 材料と高圧凍結法

2.1 植物材料の準備

我々が主に研究に使用しているのは、タマネギの子葉表皮および タマネギとタバコの根端分裂組織である.タマネギの子葉表皮は発 芽まもない時期に活発に分裂して表皮細胞や気孔を形成している. この子葉基部は円筒状(図1a)なので、懸濁培養細胞などと比べ て切片作製の際に方向を決め易い.また、表皮細胞の細胞表層の広 い範囲を子葉の接線縦断面の1枚の切片で観察できるため、細胞表 層の微小管の解析に適している.タマネギの根端は比較的大きいた め、すべての細胞を良い状態で凍結することは難しいが、我々の方 法では表層から3層目までの細胞はほぼ良い条件で凍結が可能であ る.タバコの根は非常に細い(直径約 200 μm)ため根端のすべて の細胞を良い条件で凍結することが可能である²⁾.

植物細胞内に含まれる成分の中には、それ自体凍結保護剤(cryoprotectant)の役割をするものも多く含まれている.しかし、その 含量は生育条件で異なってくる.一般に蒸留水で育てた実生に比べ ショ糖を含む溶液で育てた実生の方が凍結状態の良い細胞が多い. タマネギの根端細胞では、蒸留水で育てたものでは良い凍結状態の 細胞は少なかったが、ショ糖を含む溶液で育てたものを使用するこ

Yoshinobu Mineyuki, Ichirou Karahara, Takashi Murata, Marisa Otegui, Thomas H. Giddings, and L. Andrew Staehelin: High pressure freezing in plant tissue a 〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1 TEL: 0824-22-7111 Ext 2836; FAX: 0824-24-0734

E-mail: mineyuk@hiroshima-u.ac.jp

2001年3月8日受付

^a広島大学大学院理学研究科,^b富山大学理学部 ^c東京大学大学院総合文化研究科 ^dMCD Biology, University of Colorado

とで、満足のいく凍結結果の得られる細胞数が増加した.ただ、0. 1 M ショ糖存在下では、タマネギでは種子の発芽に影響がでるため、 まず 0.05 M ショ糖存在下で種子を発芽させ、凍結する1日前にシ ョ糖の濃度を 0.1 M に上げるようにしている (表1,2日目). タ バコの場合は、3.5%ショ糖(ほぼ 0.1 M)と栄養塩類を含む培養 液を使用している.

2.2 高圧凍結

高圧凍結装置は BAL-TEC AG の HPM-010 を使用している. 試 料ホルダーは直径 3 mm の円筒状の空間に金属製のハット (キャリ ア) に挟んだ試料を置く形に設計されたもの (BAL-TEC AG, Specimen Carrier Mounting Fixture, BU012 117-T) を使用し, 目 的に応じていくつかのハットを使い分けている (図1). 凍結置換 ・樹脂包埋用の試料作製には, 真鍮製で 0.3 mm の深さの溝を持つ ハット (図1a, b: Pelco International, Cat# 39201) を使用して いる. タマネギ子葉は, 0.1 M のショ糖溶液中で 1~1.5 mm 長の



図1 タマネギ子葉のハットへの挿入方法.(a)右:タマネギ 実生からの子葉基部の切り出し方.左:2つに縦断した子葉基 部を凍結置換・樹脂包埋用のハットの溝に挿入した模式図.中 央二つの長方形が子葉の切片である.(b)(a)で試料を挿入し たハット(a左図)の中央縦断面.(c)タマネギ子葉基部を凍 結エッチング用のハットに挿入した時の模式図.中央縦断面.

表1 タマネギ子葉の高圧凍結・凍結置換・樹脂包埋試料の作製法

0日目	(13:00)	種子を0.05M ショ糖溶液に浸したろ紙の上に播種
2日目	(13:00)	発芽直後の実生を0.1M ショ糖溶液に浸したろ紙の上 に移動
3日目	(13:00)	0.1M ショ糖溶液下で子葉の一部を切り取り、ハット に挿入し髙圧凍結後、一時液体窒素中に保存
	(16:00)	アセトンに溶かした2%OsO,溶液の入った容器を、液 体窒素で凍結する。その中にハットに載った試料を入 れ、容器を-80℃に移動し凍結置換(2日以上、我々 は普通3日間行っている)
6日目	(16:00)	試料の入った容器を~20℃に移動(1日)
7日目	(16:00)	試料の入った容器を4℃に移動(一晩)
8日日	(08:30)	試料の入った容器を室温に移動(1 時間)
	(09:30)	試料の入った容器を40℃に移動(4時間)
	(13:30)	溶液を4℃のアセトンに置換(1時間)
	(15 :3 0)	試料を4℃でメタノールに溶かした5%酢酸ウラン溶液 で処理(2時間)
	(17:30)	溶液をアセトンに置換し、室温に移動(2~3時間)
		(この間に試料をハットからはずす)
	(19:30)	溶液を1% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(一晩)
9日目	(08:30)	溶液を2 % Spurr樹脂(-DMAE)に置換(2時間)
	(10:30)	溶液を4 % Spurr樹脂(-DMAE)に置換(2時間)
	(12:30)	溶液を6 % Spurr樹脂(-DMAE)に置換(2時間)
	(14:30)	溶液を8 % Spurr樹脂(-DMAE)に置換(2時間)
1	(16:30)	溶液を10% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(2時間)
	(18:30)	溶液を12.5% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(一晩)
10日目	(08:30)	溶液を25% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(10時間)
	(18:30)	溶液を50% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(1日)
11日目	(16:30)	溶液を75% Spurr樹脂(-DMAE)に置換(1日)
12日目	(16:30)	溶液を100% Spurr樹脂 (-DMAE) に置換(1日)
13日目	(16:30)	溶液を100% Spurr樹脂 (-DMAE) に置換(1日)
14日目	(16:30)	溶液を100% Spurr樹脂 (+DMAE) に置換(1日)
15日目	(16:30)	溶液を100% Spurr樹脂 (+DMAE) に置換 (一晩)
16日目	(08:30)	溶液を100% Spurr樹脂 (+DMAE) に置換 (8時間)
	(16:30)	試料を100% Spurr樹脂(+DMAE)で包埋、70℃で重合
17日目	(08:30)	Spurr樹脂の重合完了

各列は左からそれぞれ、処理した日、時間、処理項目を示している。 Spurr樹脂(+DMAE)は一般に使用されている方法で4種の液を混合した ものを、Spurr樹脂(-DMAE)は、加速剤DMAEを混合していないものを 意味する。

円筒状に切り出した後、この試料の中央部を縦方向に切断して、二 つの半円筒状の試料にする. この試料を 0.1 M のショ糖溶液の入 ったハットの溝に素早く入れ、同じ型のハットの溝のない側を下に して蓋をする (図1b). 試料の周りに空気が入らないよう注意が必 要である. 我々の材料では 0.1 M のショ糖溶液中で実生を生育さ せているため、培養液 (0.1 M のショ糖溶液) をそのまま凍結保護 剤として使用している.

3. 凍結置換・樹脂包埋試料作製法と切片観察結果

3.1 凍結置換·樹脂包埋

凍結置換(freeze substitution)・樹脂包埋の過程は表1にそって, タマネギ子葉の場合について説明する.タマネギ,タバコの根端の 場合も基本的には同じ方法であるが,材料によって樹脂の浸透の仕 方やその他の処理に対する効果に差があるため,樹脂置換の間隔な どは個々の材料の性質に応じて変更する必要がある.

凍結置換はアセトンに溶かした 2%OsO4 を使用して, -80°C で

2日以上行う必要がある. 高圧凍結した試料では, あまり細胞内の 分子が流出しないため,化学固定のものに比べ樹脂の浸透が悪い. そのため化学固定した試料に比べ樹脂交換を長時間かけて行う必要 がある.表1の10~17日目に示すように、タマネギの組織を Spurr 樹脂3)で包埋する場合、各ステップの間隔を10時間から1日、100 %Spurr 樹脂では数日以上放置することが必須である.また,植物 細胞では、急速に樹脂交換を行うと細胞膜が細胞壁から離れてしま うことがよくある.そのため、樹脂置換は非常に低濃度から開始し、 10%くらいまでは細かいステップで徐々に樹脂濃度を上げていく必 要がある (表1, 8~9日目). 8日目 (9:30) で行っている 40 °C で4時間の 2%OsO₄ 処理は、OsO₄ の処理をより強くすること によるコントラストの増強と、その後の樹脂の浸透を良くする目的 で行っており,効果は大きかった.注意する点としては,凍結置換 用の溶液を溶かすアセトンは市販の特級のアセトンをそのまま使用 し、モラキュラーシーブで脱水したドライアセトンを使用しないこ とである.理由は、ドライアセトンを使うと、しばしば試料を室温 にもどした段階で溶液が真っ黒になり、OsO₄の効果が減少する. 酢酸ウラン・メタノール処理以降のアセトンはドライアセトンを使 用している.

8 日目(15:30)の 4℃ で 2 時間の酢酸ウラン・メタノール処 理は,アクチン繊維をはっきりと見るために酢酸ウランを使ったブ ロック染色を行うための処理である.タマネギ根端の場合,アクチ ン繊維観察のための酢酸ウランのブロック染色を行わない場合で も,アセトンでは溶出できない細胞膜の脂質を除く目的で 4℃,2 時間のメタノール処理を行うことが必要であった.

3.2 切片観察結果

図2は、表1の方法で作製したタマネギ子葉表皮の 250 nm 厚の 切片を,超高圧電子顕微鏡⁴⁾を使用して加速圧 500 KV で -60° か ら $+60^{\circ}$ まで 1.5° おきに傾けてとった画像を元に、トモグラフ ィー法を使って計算して得た画像の一部である.図は厚さ 1.4 nm の超薄切片像に相当する.図2aは分裂前期の表皮細胞の外側接線 縦断切片像で,細胞膜直下の細胞質の部分がうまく凍結できている ことが分かる.微小管,アクチン繊維(AF),クラスリン被覆小胞 (CV),被覆ビット(CP)等の細胞骨格や膜系が明瞭に観察できる. また,中央部に見える微小管の端(太い矢印)は、脱重合型の開裂 端構造をしており、この微小管が脱重合していることを示唆してい る.従来行われている超薄切片(厚さ 90 nm)では、微小管が数本 重なることのできる厚さがあるため、微小管の端の構造をはっきり と判定するのにしばしば問題があった.そのため、微小管端の構造 解析には、上述のトモグラフィー法と厚さ $30 \sim 50$ nm の超超薄の 連続切片を作製して観察する方法をとっている⁵⁾.

我々の研究の初期の段階で,凍結がうまくいっているような細胞 でも微小管と識別できる構造の数が少ないことがたびたびあった. その後の研究で,微小管は他の細胞内構造に比べ凍結で影響を受け 易く,他のオルガネラや細胞膜がうまく凍結できている様に見える 細胞でも,既に微小管が変形していることが分かった²⁾. 図2bは その例で,電顕トモグラフィー法で観察すると,微小管の管状構造 が部分的につぶれたり折れ曲がっていることが明瞭に分かる(矢



図2 表1の方法で作製したタマネギ子葉表皮の接線縦断面像. (a) うまく凍結できた細胞膜直下の分裂準備帯(preprophase band)の一部.AF(矢尻):アクチン繊維,CV:被覆小胞, CP:被覆ピット,太い矢印:脱重合型の開裂端構造を示す微 小管の端.(b)細胞表層の微小管.凍結不良のため微小管の 構造が変形している.微小管の管状構造がつぶれたり折れ曲が ったりしている(矢印).

印).

4. 凍結エッチングレプリカ法

凍結エッチングレプリカ法では、凍結した試料をそのまま割断し、 エッチングしてレプリカを作製するため、樹脂置換等の過程で人工 産物を生じる可能性の大きい超薄切片法に比べ、より真実を繁栄し た像が期待できる.図3は凍結エッチングレプリカ法で作製した試 料で得た画像で、細胞膜直下の微小管とそれを架橋している構造が 見える.以下、この方法について説明する.

超薄切片法の時に用いたハットは、凍結割断の際にハットを支え る所がないため、凍結割断には不向きである.そこで、凍結割断用 の試料には Craig ら⁶⁾の開発したハットを使用している(図1c). このハットは、試料を載せる側に直径 1 mm の試料を入れる穴があ り、それとうまくかみあう蓋とでできている.試料を載せる側のハ ットには、凍結割断の時試料を支えることができる構造になってい る.このハットに円筒状の試料をそのまま入れ、周りに凍結保護剤 を入れて蓋をする.凍結保護剤として 0.1 M ショ糖・20%デキス トラン (mw. 35000-45000)溶液に酵母を加えたものを使用する. 試料の大部分は細胞膜や細胞壁の部分で割断されるため、小さなレ ブリカでは、試料をみているのか周りのデキストラン等の凍結保護 剤の部分を見ているのかわかりにくいことがあった.そこで、試料 の周りに酵母を入れることで、タマネギの組織の部分が判定できや すいようにしている.試料の凍結割断・エッチングは、BAL-TEC AG の BAF060 を使用し、-115°C で凍結割断後、温度を -100°C



図3 タマネギ子葉細胞の凍結エッチングレプリカ像.PM:細胞膜,矢印:微小管.微小管と微小管の間に架橋構造が分かる.

まで上昇させて15分間エッチングを行う.エッチングした試料を回 転させながら 25°の角度から白金を回転蒸着,続いて真上から炭素 を回転蒸着してレプリカ膜を補強する.白金の厚さは 2.5 nm に, 炭素は 20 nm にしている.その後,温度を -80°C まで上昇させ 30分間放置し,再度,炭素を真上から回転蒸着し,レプリカ膜を再 補強する.室温に取り出した試料は20%ショ糖溶液中でハットから 分離し,蒸留水で5%に薄めた市販の漂白剤(次亜塩素酸ナトリウ ム)に浮かべ,徐々に漂白剤の濃度を50%まで上げる(この間,全 体で2時間).蒸留水で30分,2回の洗浄後,70%硫酸に一晩,7.8 %クロム酸カリウム・33%硫酸の混合液で5時間処理することで試 料を完全に溶かし,そのレプリカを蒸留水で30分,2回の洗浄後グ リッドに載せて観察する.この方法は,将来立体的な観察に有効な 手段であると考えているが,割断で目的の場所が現われる確率が低 いため,定量的な観察に向かない問題がある.

5. おわりに

高圧凍結で多くの植物材料が凍結可能になり、今後ますます高圧 凍結法の利用が増大すると思われる.今後の展開としては、図2に も示した様に他の新しい観察技法,例えば電顕トモグラフィー法な どと併用することにより、より真実に近い形で微細構造の3次元的 解析が進むと考えている.

図2の画像作製にあたってはコロラド大学の Boulder Laboratory for 3-Dimentional Fine Structure⁴⁾ のスタッフに多くの助言と協力 いただきましたことを感謝します.本研究は文部省科学研究費補助 金09044225および12640651によるものである.

文 献

- 1) 村田長芳, 菅沼龍夫, 峰雪芳宣: 電子顕微鏡, 35, 109-110 (2000)
- 峰雪芳宣,村田隆,Giddings,T.,Staehelin,L.A.: Plant Morph., 10, 30-39 (1998)
- 3) Spurr, A.R.: J. ultrastruct. Res., 26, 31-43 (1969)
- 4) http://bio3d.Colorado.EDU/index.html
- Murata, T., Karahara, I., Giddings, T., Staehelin, L.A. and Mineyuki, Y.: 16th Australian Conf. Electron Micros., Canberra, 2000, p.90
- Craig, S., Gilkey, J.C. and Staehelin, L.A.: J. Microsc., 48, 103–106 (1987)